

骨髓间充质干细胞对烟雾吸入性损伤兔 早期炎症因子分泌的影响

陈雯 朱峰 郭光华 詹剑华

【摘要】 目的 探讨骨髓间充质干细胞(MSCs)对烟雾吸入性损伤早期外周血及肺组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL-1 β 、IL-6、IL-10)分泌的影响。方法 全骨髓培养法体外培养兔 MSCs,用流式细胞术鉴定。将 56 只健康新西兰大耳白兔按随机数字表法分为正常对照组(C组, $n=8$)、烟雾吸入性损伤组(S组, $n=24$)、烟雾吸入性损伤+MSCs 移植组(M组, $n=24$),后两组再分为伤后 2、4、6 h 亚组,每组 8 只。采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血浆及肺组织匀浆液中促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及抗炎因子 IL-10 的含量。结果 与 C 组比较, S 组各时间点血浆促炎、抗炎因子均显著升高;各时间点肺组织促炎因子显著升高,抗炎因子无明显变化。与 S 组比较, M 组各时间点血浆促炎因子显著下降,抗炎因子显著升高[6 h 时 TNF- α ($\mu\text{g/L}$): 1.7 ± 1.7 比 4.1 ± 1.6 , IL-1 β (ng/L): 9.9 ± 1.7 比 21.2 ± 2.6 , IL-6($\mu\text{g/L}$): 1.0 ± 0.3 比 1.3 ± 0.2 , IL-10(ng/L): 15.2 ± 4.4 比 7.9 ± 3.5 , 均 $P < 0.05$];各时间点肺组织促炎因子显著降低,而抗炎因子仅在 4 h、6 h 显著升高[6 h 时 TNF- α (ng/L): 503.0 ± 156.4 比 587.7 ± 171.2 , IL-1 β (ng/L): 0.4 ± 0.2 比 0.6 ± 0.2 , IL-6(ng/L): 155.2 ± 13.7 比 350.2 ± 20.3 , IL-10(ng/L): 23.3 ± 5.4 比 11.0 ± 5.6 , 均 $P < 0.05$]。结论 MSCs 移植能降低烟雾吸入性损伤早期促炎因子水平,升高抗炎因子水平,改善全身炎症反应,对烟雾吸入性损伤肺组织具有一定的保护作用。

【关键词】 骨髓间充质干细胞; 移植; 肺损伤; 炎症因子; 免疫调节

Effect of bone marrow mesenchymal stem cells engraftment on secretion of inflammatory cytokine in the early stages of smoke inhalation injury in rabbits CHEN Wen, ZHU Feng, GUO Guang-hua, ZHAN Jian-hua. Department of Burn, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China

Corresponding author: GUO Guang-hua, Email: guogh2000@hotmail.com

【Abstract】 **Objective** To explore the effect of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) engraftment on secretion of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukins (IL-1 β , IL-6, IL-10) in peripheral blood and lung homogenates in the early stages of smoke inhalation injury. **Methods** MSCs were proliferated by the method of whole marrow culture and identified by flow cytometry. Fifty-six healthy New Zealand rabbits were randomly divided into control group (C group, $n=8$), smoke inhalation injury group (S group, $n=24$) and smoke inhalation injury + MSCs engraftment group (M group, $n=24$). The latter two groups were subdivided into 2, 4, 6 hours after injury subgroups, with 8 rabbits in each group. The levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 in peripheral blood and lung homogenates were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Compared with C group, concentration of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in peripheral blood at each time point in S group were increased significantly. The concentration of pro-inflammatory cytokines in lung homogenate at each time point in S group was significantly higher than those in C group, and that of anti-inflammatory cytokines showed no significant changes. Compared with the S group, concentration of pro-inflammatory cytokines in peripheral blood in M group was decreased significantly, and that of anti-inflammatory cytokines was increased significantly [6 hours TNF- α ($\mu\text{g/L}$): 1.7 ± 1.7 vs. 4.1 ± 1.6 , IL-1 β (ng/L): 9.9 ± 1.7 vs. 21.2 ± 2.6 , IL-6 ($\mu\text{g/L}$): 1.0 ± 0.3 vs. 1.3 ± 0.2 , IL-10 (ng/L): 15.2 ± 4.4 vs. 7.9 ± 3.5 , all $P < 0.05$]. Concentration of pro-inflammatory cytokines at each time point in M group was decreased significantly when compared with S group in lung homogenate, while only anti-inflammatory cytokine at 4 hours and 6 hours was increased significantly [6 hours TNF- α (ng/L): 503.0 ± 156.4 vs. 587.7 ± 171.2 , IL-1 β (ng/L): 0.4 ± 0.2 vs. 0.6 ± 0.2 , IL-6 (ng/L): 155.2 ± 13.7 vs. 350.2 ± 20.3 , IL-10 (ng/L): 23.3 ± 5.4 vs. 11.0 ± 5.6 , all $P < 0.05$]. **Conclusion** MSCs engraftment could decrease pro-inflammatory cytokines and increase anti-inflammatory cytokines in the early stages of smoke inhalation injury, thus ameliorates inflammatory response, which confers protective effect on smoke inhalation injury.

【Key words】 Bone marrow mesenchymal stem cell; Engraftment; Lung injury; Inflammatory cytokine; Immunomodulation

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.01.006

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2008BA168B06); 国家自然科学基金(81060155); 江西省教育厅青年科学基金(GJJ09432)

作者单位: 330006 江西, 南昌大学第一附属医院烧伤外科 通信作者: 郭光华, Email: guogh2000@hotmail.com

烟雾吸入性损伤的实质是急性肺损伤(ALI),其进一步发展即为急性呼吸窘迫综合征(ARDS),为烧伤死亡的主要原因之一。目前认为烟雾吸入性损伤机制是一种肺内过度性失控性炎症反应,而骨髓间充质干细胞(MSCs)证实其具有抗炎-免疫调节特性^[1]。本研究中通过探讨 MSCs 移植对烟雾吸入性损伤早期免外周血和肺组织中促炎因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL-1 β 、IL-6)及抗炎因子 IL-10 分泌的影响,为深入认识 MSCs 对烟雾吸入性损伤抗炎-免疫调节作用的机制以及未来临床应用干细胞移植治疗吸入性损伤提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 动物及主要试剂:体重(3.88±0.55) kg 健康新西兰大耳白兔 56 只,雌雄不拘,由南昌大学医学院实验动物中心提供,动物合格证号:赣动 96021。控烟、控时烟雾吸入性损伤致伤仪由南昌大学烧伤研究所自制;兔 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 定量酶联免疫吸附法(ELISA)检测试剂盒(上海森雄科技实业有限公司),Model 680 酶标仪(美国 BIO-RAD 公司),流式细胞仪(美国 B-D 公司),DMEM-F12 液体培养基、胎牛血清(FBS,美国 Hyclone 公司),0.25% 含 1:1 乙二胺四乙酸(EDTA)的胰蛋白酶(北京 Solarbio 公司)等。

1.2 兔 MSCs 的分离、培养及鉴定:参考文献^[2],通过形态学观察及流式细胞术检测细胞特异性抗原以鉴定所培养细胞是否为 MSCs。

1.3 动物模型制备:使用自行研制的全自动烟雾致伤控制仪建立兔烟雾吸入性损伤模型,根据临床表现、病理、血气进行模型鉴定^[3]。

1.4 动物分组及实验实施:健康成年家兔按随机数字表法分为 3 组。正常对照组(C 组,8 只);经耳缘静脉注入 10 ml 磷酸盐缓冲液(PBS);烟雾吸入性损伤组(S 组,24 只):伤后立即经耳缘静脉注入

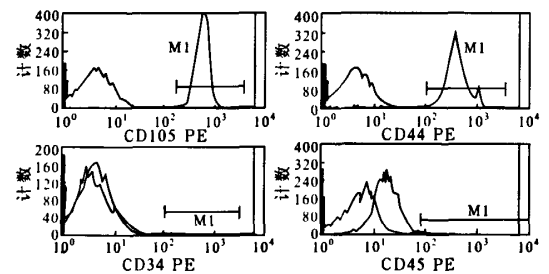
10 ml PBS;烟雾吸入性损伤+MSCs 移植组(M 组,24 只):伤后立即经耳缘静脉注入 10 ml 含有第 3 代 MSCs(1×10⁷ 个/ml)的 PBS;后两组又分为制模后 2、4 和 6 h 亚组,每组 8 只。

1.5 检测指标及方法:于相应时间点经耳缘静脉采血离心,取血浆-80℃冻存备检;同时开胸取双肺,分离左肺制备组织匀浆备检。分别采用 ELISA 测定外周血及肺组织匀浆液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 IL-10 含量,操作按试剂盒说明书要求进行。

1.6 统计学方法:使用 SPSS 15.0 统计软件进行分析,实验数据结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。不同时间点的比较采用单因素方差分析,各组间比较采用独立样本 t 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MSCs 的鉴定:采用全骨髓培养法原代培养 MSCs,可以观察到细胞贴壁生长,数量较多,为梭形,局部呈多个散在分布的细胞集落。传代后细胞迅速扩增,呈均匀长梭形,紧密排列,类似旋涡状。采用流式细胞仪检测显示:CD34(-)、CD45(-)、CD44(+)、CD105(+),说明该细胞为 MSCs(图 1)。



注:MSCs:骨髓间充质干细胞,PE:藻红蛋白

图 1 流式细胞术检测兔 MSCs 结果

2.2 血浆促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及抗炎因子 IL-10 含量变化(表 1):烟雾吸入性损伤后 S 组 2、4、6 h 血浆 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 均迅速增

表 1 MSCs 对烟雾吸入性损伤兔伤后不同时间点血浆及肺组织匀浆中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 IL-10 的影响($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 动物数 | TNF- α | | IL-1 β (ng/L) | | IL-6 | | IL-10(ng/L) | |
|---------|-----|-----------------------|---------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|
| | | 血浆(μ g/L) | 肺组织(ng/L) | 血浆 | 肺组织 | 血浆(μ g/L) | 肺组织(ng/L) | 血浆(μ g/L) | 肺组织(ng/L) |
| C 组 | 8 | 0.2±0.4 | 24.4±3.9 | 10.0±1.8 | 0.4±0.1 | 0.7±0.0 | 28.8±2.2 | 2.4±0.6 | 14.2±1.1 |
| S 组 2 h | 8 | 4.8±1.3 ^a | 697.6±174.2 ^a | 18.1±1.6 ^a | 1.6±0.2 ^a | 1.4±0.1 ^a | 758.3±180.7 ^a | 5.5±3.4 ^a | 18.2±8.2 |
| 4 h | 8 | 4.4±1.8 ^a | 1451.0±257.0 ^a | 18.0±1.0 ^a | 1.0±0.2 ^a | 1.3±0.2 ^a | 575.3±138.2 ^a | 5.6±1.7 ^a | 16.7±9.3 |
| 6 h | 8 | 4.1±1.6 ^a | 587.7±171.2 ^a | 21.2±2.6 ^a | 0.6±0.2 ^a | 1.3±0.2 ^a | 350.2±20.3 ^a | 7.9±3.5 ^a | 11.0±5.6 |
| M 组 2 h | 8 | 2.0±1.0 ^{ab} | 241.1±99.0 ^{ab} | 9.3±1.2 ^b | 0.5±0.2 ^b | 1.0±0.4 ^b | 235.3±32.3 ^{ab} | 13.0±3.6 ^{ab} | 15.3±3.2 |
| 4 h | 8 | 1.9±1.3 ^{ab} | 583.7±139.1 ^{ab} | 9.4±1.9 ^b | 0.5±0.2 ^b | 1.0±0.3 ^b | 254.4±50.4 ^{ab} | 11.3±8.5 ^{ab} | 26.9±6.9 ^{ab} |
| 6 h | 8 | 1.7±1.7 ^{ab} | 503.0±156.4 ^{ab} | 9.9±1.7 ^b | 0.4±0.2 ^b | 1.0±0.3 ^b | 155.2±13.7 ^{ab} | 15.2±4.4 ^{ab} | 23.3±5.4 ^{ab} |

注:MSCs:骨髓间充质干细胞,TNF- α :肿瘤坏死因子- α ,IL-1 β :白细胞介素-1 β ,IL-6:白细胞介素-6,IL-10:白细胞介素-10;C 组:正常对照组,S 组:烟雾吸入性损伤组,M 组:烟雾吸入性损伤+MSCs 移植组,与 C 组比较,^aP<0.05;与 S 组同期比较,^bP<0.05

加,并显著高于C组(均 $P<0.05$)。与S组比较,M组2、4、6 h 血浆 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 均显著降低,IL-10 含量显著升高(均 $P<0.05$);其中各时间点血浆 IL-1 β 及 IL-6 含量与 C 组比较无差异,而血浆 TNF- α 、IL-10 含量仍高于 C 组(均 $P<0.05$)。S 组、M 组组内比较差异均无统计学意义。

2.3 肺组织促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及抗炎因子 IL-10 含量变化(表1);S 组致伤后 2、4、6 h 肺组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量均较 C 组显著升高(均 $P<0.05$),而 IL-10 含量较 C 组无差异(均 $P>0.05$)。M 组致伤后 2、4、6 h 肺组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量均较 S 组显著降低,而致伤后 4 h 和 6 h 时 IL-10 含量较 S 组显著升高(均 $P<0.05$);其中肺组织 IL-1 β 含量与 C 组比较无显著差异(均 $P>0.05$),TNF- α 和 IL-6 含量仍较 C 组显著升高,而 IL-10 含量在 4 h 和 6 h 才显著升高(均 $P<0.05$)。S 组、M 组组内比较差异均无统计学意义。

3 讨论

目前,对 ALI/ARDS 仍无特异性治疗措施以改善其预后。除了加快受损肺组织的修复过程外,减少炎症反应被认为可能是改善其预后的另外一个重要方向^[4]。大量的实验都证明 MSCs 具有诱导免疫耐受和免疫抑制的特性,近几年在肺损伤模型中发现, MSCs 能够在 ALI 时下调促炎症细胞因子的同时上调抗炎细胞因子,并减轻肺水肿,从而对 ALI/ARDS 起到一定的治疗作用^[5-9]。

本研究结果显示,烟雾吸入性损伤模型兔外周血及肺组织促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 均较正常对照组显著升高,尤其是炎症反应的启动因子 TNF- α 急剧升高并维持于较高水平,而抗炎因子 IL-10 产生则相对缓慢甚至减少,在血浆中 6 h 才达高峰,而肺组织中 6 h 甚至低于正常对照组。说明在烟雾吸入性损伤过程中,肺局部相继发生促炎症反应及抗炎反应,ALI 早期存在促炎症反应/抗炎反应失衡,抗炎反应的出现可能稍迟于促炎症反应,这与国内李洪霞等^[10]的实验结果吻合。从本实验结果还可以看到,静脉注射 MSCs 后烟雾吸入性损伤兔的主要促炎因子水平下降,有的甚至接近于正常水平,而抗炎因子水平显著升高,拮抗或抑制炎症反应的发生和扩大。这些促炎因子的降低及抗炎因子的升高有利于防止炎症的过度对肺组织的损害,利于重建促炎症反应/抗炎反应的平衡。提示 MSCs 对烟雾吸入性损伤早期各种炎症因子分泌有干预作用,进而对损伤肺组织起到保护作用。

MSCs 能减轻炎症反应,考虑与免疫调节有关,但其机制尚不清楚,可能与以下因素有关:①MSCs 表面具有独特的受体,其细胞能表达多种表面抗原及分泌细胞黏附分子,通过介导白细胞、淋巴细胞与炎症部位的黏附作用,从而可能抑制髓过氧化物酶、阻止细胞间黏附分子-1 表达上调,降低炎症反应程度^[11]。②MSCs 能抑制免疫细胞增殖、活化、因子的分泌以及诱导 T 淋巴细胞的凋亡;诱导免疫偏离使原始辅助性 T 淋巴细胞(TH0)向 TH2 细胞分化,增加具有免疫抑制功能的调节性 T 淋巴细胞亚群。③MSCs 通过分泌可溶性免疫调节因子如转化生长因子- β 1、肝细胞生长因子等对淋巴细胞增殖起抑制作用^[1,9]。

总之,在烟雾吸入性损伤过程中, MSCs 的独特表面抗原能阻止炎症发展,增强抗炎能力,协调肺脏局部促炎与抗炎反应相互作用的平衡,使机体内环境保持稳定,减轻组织损伤程度,进而有可能抑制后期的肺纤维化,乃至改善烟雾吸入性损伤的预后。

参考文献

- [1] Ren G, Zhang L, Zhao X, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*, 2008, 2: 141-150.
- [2] 朱峰,胡贞贞,郭光华,等.骨髓间充质干细胞的分离、体外培养、鉴定和体外标记. *南通大学学报(医学版)*, 2010, 30: 157-160, 163.
- [3] 朱峰,郭光华,王年云,等.兔烟雾吸入性损伤模型的改进和建立. *广东医学*, 2009, 30: 1800-1802.
- [4] Yen CC, Yang SH, Lin CY, et al. Stem cells in the lung parenchyma and prospects for lung injury therapy. *Eur J Clin Invest*, 2006, 36: 310-319.
- [5] Mei SH, McCarter SD, Deng Y, et al. Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by mesenchymal stem cells overexpressing angiopoietin 1. *PLoS Med*, 2007, 4: e269.
- [6] Gupta N, Su X, Popov B, et al. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J Immunol*, 2007, 179: 1855-1863.
- [7] Iyer SS, Rojas M. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: novel concept for future therapies. *Expert Opin Biol Ther*, 2008, 8: 569-581.
- [8] 蔡存良,文仲光,周岗,等.骨髓间充质干细胞移植对急性肺损伤大鼠血浆 TNF- α 、IL-6 水平的影响. *感染·炎症·修复*, 2006, 7: 98-101.
- [9] 朱峰,王红梅,郭光华,等.骨髓间充质干细胞在急性肺损伤中抗炎作用的研究进展. *中国危重病急救医学*, 2009, 21: 700-702.
- [10] 李洪霞,张进川,赵亚力,等.白细胞介素-10 对急性肺损伤炎症/抗炎介质表达的影响. *中国危重病急救医学*, 2005, 17: 338-341.
- [11] 季亮飞,黄亮.细胞黏附分子与急性肺损伤. *中国危重病急救医学*, 2004, 16: 444-446.

(收稿日期:2010-08-03)

(本文编辑:李耀平)

骨髓间充质干细胞对烟雾吸入性损伤兔早期炎症因子分泌的影响

作者: [陈雯](#), [朱峰](#), [郭光华](#), [詹剑华](#), [CHEN Wen](#), [ZHU Feng](#), [GUO Guang-hua](#), [ZHAN Jian-hua](#)
作者单位: [南昌大学第一附属医院烧伤外科, 江西, 330006](#)
刊名: [中国危重病急救医学](#) **ISTIC** **PKU**
英文刊名: [CHINESE CRITICAL CARE MEDICINE](#)
年, 卷(期): 2011, 23(1)

参考文献(22条)

1. [朱峰;胡贞贞;郭光华](#) [兔骨髓间充质干细胞的分离、体外培养、鉴定和体外标记](#) 2010
2. [Ren G. Zhang L. Zhao X](#) [Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide](#) 2008
3. [Ren G;Zhang L;Zhao X](#) [Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide](#)[外文期刊] 2008
4. [朱峰. 胡贞贞. 郭光华](#) [兔骨髓间充质干细胞的分离、体外培养、鉴定和体外标记](#) 2010
5. [季宪飞;黄亮](#) [细胞黏附分子与急性肺损伤](#)[期刊论文]-[中国危重病急救医学](#) 2004(7)
6. [朱峰. 郭光华. 王年云. 彭燕](#) [兔烟雾吸入性损伤模型的改进和建立](#) 2009(12)
7. [李洪霞;张进川;赵亚力](#) [白细胞介素-10对急性肺损伤炎症/抗炎介质表达的影响](#)[期刊论文]-[中国危重病急救医学](#) 2005(6)
8. [Yen CC. Yang SH. Lin CY](#) [Stem cells in the lung parenchyma and prospects for lung injury therapy](#) 2006
9. [朱峰;王红梅;郭光华](#) [骨髓间充质干细胞在急性肺损伤中抗炎作用的研究进展](#)[期刊论文]-[中国危重病急救医学](#) 2009(11)
10. [Mei SH. McCarter SD. Deng Y](#) [Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by mesenchymal stem cells overexpressing angiopoietin 1](#) 2007
11. [蔡存良;文仲光;周岗](#) [骨髓间充质干细胞移植对急性肺损伤大鼠血浆TNF- \$\alpha\$ 、IL-6水平的影响](#) 2006
12. [Gupta N. Su X. Popov B](#) [Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice](#) 2007
13. [Iyer SS;Rojas M](#) [Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells:novel concept for future therapies](#)[外文期刊] 2008(5)
14. [Iyer SS. Rojas M](#) [Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells:novel concept for future therapies](#) 2008
15. [Gupta N;Su X;Popov B](#) [Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice](#) 2007
16. [蔡存良. 文仲光. 周岗](#) [骨髓间充质干细胞移植对急性肺损伤大鼠血浆TNF- \$\alpha\$ 、IL-6水平的影响](#) 2006
17. [Mei SH;McCarter SD;Deng Y](#) [Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by mesenchymal stem cells overexpressing angiopoietin 1](#)[外文期刊] 2007
18. [朱峰. 王红梅. 郭光华. 詹剑华](#) [骨髓间充质干细胞在急性肺损伤中抗炎作用的研究进展](#) 2009(11)
19. [Yen CC;Yang SH;Lin CY](#) [Stem cells in the lung parenchyma and prospects for lung injury therapy](#)[外文期刊] 2006(5)

20. [李洪霞](#), [张进川](#), [赵亚力](#), [郝好杰](#) [白细胞介素-10对急性肺损伤炎症/抗炎介质表达的影响](#) 2005(6)
21. [朱峰](#); [郭光华](#); [王年云](#) [兔烟雾吸入性损伤模型的改进和建立](#) [期刊论文]-[广东医学](#) 2009(12)
22. [季宪飞](#), [黄亮](#) [细胞黏附分子与急性肺损伤](#) 2004(7)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgwzbjyx201101006.aspx